

DOI:10.13350/j.cjpb.230808

• 论著 •

噬菌体 vB_KpnP_QH2 的生物学特性和基因组分析^{*}

李晓瑞¹, 赵文轩², 张华尧³, 李臻鹏¹, 周海健¹, 阚飙¹, 樊粉霞^{1**}

(1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室, 北京昌平 102206;
2. 山西医科大学公共卫生学院; 3. 山东大学公共卫生学院)

【摘要】 目的 对从医院污水中分离筛选的特异裂解多重耐药肺炎克雷伯菌的噬菌体 vB_KpnP_QH2(简称 QH2) 进行生物学特性和基因组信息分析。方法 将从医院污水中获得噬菌体 QH2 用琼脂双层平板法分离纯化, 测定 QH2 生物学特性, 用电镜观察其形态大小; 通过测序得到 QH2 全基因组信息并进行注释和分析。结果 QH2 属于 Slopekvirinae 亚科, Drulisvirus 属, 有尾噬菌体; QH2 裂解宿主菌可形成有晕环的噬菌斑; QH2 的最佳感染复数为 0.00001; 其感染潜伏期为 5 min, 爆发期为 15 min, 20 min 后进入稳定期, 裂解量为 2.8×10^9 pfu/cell。QH2 基因组全长 43 083 bp, 为双链 DNA, GC 含量 53.88%; 预测并注释 52 个开放阅读框, 不包含 tRNA 结构、毒力因子和耐药基因; 序列分析显示 QH2 的 ORF12 和 ORF13 编码裂解细菌相关蛋白。结论 从医院污水中分离筛选的 QH2 能特异裂解多重耐药肺炎克雷伯菌, 其生物学特性稳定、安全, 为研究噬菌体与宿主间的相互作用及多重耐药细菌感染的治疗提供实验材料。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组学分析

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0911-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):911-916.]

Biological characteristics and genome analysis of novel phage vB_KpnP_QH2

LI Xiaorui¹, ZHAO Wenxuan², ZHANG Huayao³, LI Zhenpeng¹, ZHOU Haijian¹, KAN Biao¹, FAN Fenxia¹ (1. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 100021, China; 2. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shanxi Medical University; 3. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University)

【Abstract】 **Objective** Biological characteristics and genomic information analysis of bacteriophage vB_KpnP_QH2 (abbreviated as QH2), which is specifically lytic to multiple drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated and screened from hospital sewage. **Methods** The agar double-layer plate method was used to isolate and purify the bacteriophage QH2 obtained from hospital sewage, and the biological characteristics of QH2 were determined. The morphological observation was conducted to analyze its shape and size by electron microscopy. The QH2 genome was annotated and analyzed by sequencing technology. **Results** QH2 has an icosahedral head and a retractable tail. It belongs to a tailed phage species of the genus *Slopekvirinae*, subfamily *Drulisvirus*, and has a close evolutionary relationship with *Klebsiella* phage VLC1. QH2 lysis of the host bacteria can form bacteriophage plaques with halo rings. The optimal multiplicity of infection is 0.0001, the one-step growth curve revealed that phage QH2 had an infection duration of 40 minutes, 5 minutes latent period, and a highly specific to host strain, with a lysis amount is 2.8×10^9 pfu/cell. The genome of QH2 is 43 083 base pairs, double-stranded DNA (dsDNA), with a G+C content of 53.88%; It contains 52 open reading frames that were predicted and annotated, not including tRNA, virulence factors, and antibiotic resistance genes. Sequence analysis showed that ORF12 and ORF13 of QH2 encode bacteriolytic-related proteins. **Conclusion** QH2, which is specifically lytic to multiple drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated and screened from hospital sewage, has stable and safe biological characteristics, providing experimental materials for the study of the interaction between bacteriophages, their hosts, and the treatment of multiple drug-resistant bacterial infections.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; phage; biological characteristics; genome analysis

^{***}肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)兼性厌氧,属于肠杆菌科的革兰阴性菌,可以引起尿路、呼吸道以及手术部位的感染。KP属于条件致病菌,可定植于人或动物的上呼吸道、胃肠道等各种粘膜表面,尤其胃肠道部位,是后续该菌传播到其他部位的储

【基金项目】 国家重点研发计划(No. 2021YFC2300304); 公共卫生应急响应机制的运行-传染病防控(No. 10239322002002000029)。

【通讯作者】 樊粉霞, E-mail: fanfenxia@icdc.cn

【作者简介】 李晓瑞(1995-),女,河北邯郸,硕士,研究方向为病原生物学。E-mail: lixiaorui@icdc.cn

文库。KP 是医院感染细菌之一,检出率仅次于大肠埃希菌^[1-3]。近几年高致病力 KP 毒株分离的数量不断增多,健康人群对 KP 也变得易感,特别是感染耐碳青霉烯类 KP(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)病例的出现^[4]。KP 存在多种耐药机制,例如耐药质粒介导的超广谱 β -内酰胺酶可对包括第三代头孢菌素在内的多种抗生素产生耐药。外膜蛋白缺失和药物靶点的突变均可产生耐药,且耐药情况日益严重,进一步加剧了抗生素治疗的困境,寻找包括噬菌体在内的替代抗菌疗法^[5-7]显得尤为重要。

多重耐药 KP(MDR-KP)的噬菌体治疗在病人体内和体外都已成功应用,成为替代抗生素解决病原菌耐药问题的另一重要途径^[8-11]。噬菌体是存在于自然界的天然病毒,有显著的优势特点:1)安全性高,专门针对特定宿主菌而不针对人细胞或共生微生物群;2)噬菌体可通过自我复制大量扩增,从而导致宿主菌的裂解;3)噬菌体对于耐药菌的裂解可降低细菌耐药性的出现^[12-13]。当前,噬菌体已被用于治疗 MDR-KP 引起的感染^[14],并取得了良好治疗效果,这使得噬菌体治疗再次成为热点。MDR-KP 在医院分离比率持续增长,抗生素治疗的选择和配比困难加重,新的耐药菌株不断出现,相关耐药基因持续突变,导致新的耐药菌株对已有噬菌体表现为抗性表型,因此需要分离新的噬菌体不断补充噬菌体治疗库,应对抗菌治疗的困境。同时,噬菌体作为一种潜在的抗菌剂,具有明显的生物学特性,如具有特定的宿主范围、最佳感染复数、温度和 pH 稳定性等,这些特性也会限制噬菌体作为抗菌剂的应用和工业化生产。因此,分离新型噬菌体,进一步研究其相关的表征特异性具有重要意义。

本研究对从医院污水中分离的 1 株针对 KP 的新型裂性噬菌体 vB_KpnP_QH2(简称 QH2)进行生物学特性分析及鉴定,利用全基因组测序技术对噬菌体序列进行比对分析、基因注释及功能预测,为 KP 感染的噬菌体治疗提供实验材料。

材料与方法

1 材料

1.1 菌种来源 11 株不同类型的 KP 由中国疾病预防控制中心传染病控制所提供;裂解型 KP 噬菌体 QH2 由本室从医院污水中分离鉴定并保存。

1.2 主要仪器和试剂 超纯水仪(GIBCO, Invitrogen),恒温培养箱(GH400OAB, 泰斯特),立式高速离心机(CR22N, Himac),0.45 μm 过滤器(Merck Millipore),噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒(ABigen),透射电子显微镜(HT7700, 日立)。

2 方法

2.1 噬菌体的分离纯化 医院污水样品加入 5 mL SM 缓冲液过夜培养,进行噬菌体的分离筛选。取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 QHQC 宿主菌三区划线至普通培养基上,置恒温培养箱中培养。挑取单克隆菌斑至 4 mL LB 中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养至对数培养期(A_{600} 值约为 0.5);吸取滤液 100 μL 加入 4 mL QHQC 菌液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床过夜培养;第 2 d 取菌液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 500 g 离心 10 min,取上清,经 0.45 μm 一次性过滤器过滤,滤液即为富集的噬菌体原液^[15]。利用双层平板法对噬菌体进行纯化培养,挑取单噬斑,将噬菌体纯化至噬斑大小均一。

2.2 噬菌体 DNA 提取 取纯化的 QH2,加入 DNase 1 和 RNase A 水浴,再加入 NaCl 冰浴,并通过 PEG8000 震荡溶解,使 QH2 充分沉淀;离心弃上清,使用噬菌体 DNA 提取试剂盒按照说明书方法提取 DNA,取 50 μL DNA 进行测序。

2.3 噬菌体电镜观察 取纯化的 QH2 悬液以 5 000 r/min 离心 2 min,弃上清,取沉淀使用 0.45 μm 滤器进行过滤。反复操作 3 次。取最后所得滤液 1 滴滴在铜网上,静置 10 min,随后用滤纸吸去边缘多于液体,使用 2% 磷钨酸(PTA)进行染色,再吸去多于染液,室温干燥 30 min 后使用透射电子显微镜观察并拍照。

2.4 噬菌体最佳感染复数(MOI)测定 将宿主菌 QHQC 培养至对数生长期约为 10^8 CFU/ml,按照 MOI(噬菌体浓度(PFU/mL)/细菌浓度(CFU/mL))分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001 和 0.000001 的比例混合。将不同比例的混合液放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清;将沉淀用 LB 混悬,吸取 1 mL 转入 4 mL LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 3 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min 后使用 0.45 μm 滤器过滤,收集上清,利用双层平板法测定噬菌体滴度,计算 MOI。试验平行重复 3 次,取平均值。

2.5 噬菌体一步生长曲线测定 在最佳 MOI 条件下,取 1 mL 对数生长期(1×10^8 CFU/mL)的宿主菌 QHQC 与噬菌体按照一定比例混合,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 1 mL LB 重悬沉淀,再次离心,弃上清。共重复 3 次以除去未吸附的噬菌体。用 1 mL LB 将沉淀悬起,转入 9 mL LB 中,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养,分别在培养的 0 时起每间隔 10 min 取样,测定噬菌体效价。以感染时间(t)为横坐标,噬菌体滴度(PFU/mL)为纵坐标绘制一步生长曲线图。试验重复 3 次。

2.6 噬菌体基因组测序分析 取 QH2 DNA,使用 Illumina 平台对 QHQC2 进行全基因组测序,采用 FastQC(v0.11.5)软件分析数据质量,Soapnuke(v2.

0)去除低 paired reads (带接头 adapter, $sQ \leq 20$)、*plyX* 序列,使用 BWA(v0.7.17)把 clean reads 与宿主基因组比对,宿主的参考信息为 *klebsiella pneumoniae*,过滤比对长度低于 reads 总长 80% 的比对结果。使用 Megahit (v1.1.2)软件对 clean data 进行 *de novo* 组装,最终得到完整基因组。使用 Rapid Annotation using Subsystem Technologies (RAST, <https://rast.nmpdr.org/>)对全基因组信息进行注释。使用 NCBI 数据库的局部比对搜索工具(BLASTp)手动验证所有预测的开 ORFs。使用 TMHMM 服务器 v2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)和 tRNA Scan-SE(<https://Lowelab.ucsc.edu/tRNAsCAN-SE/>)以默认参数分别筛选所有编码潜在跨膜区蛋白的 ORF 基因和鉴定可能的 tRNA 编码基因。使用 BRIG(v0.95)和 Easyfig (v.2.0)生成基因组结构注释图。使用 VFDB 和 ResFinder (<https://www.mgc.ac.cn/vfs/main>; <https://cge.cbs.dtu.dk/service/resfinder/>)对噬菌体的毒力因子和耐药基因进行分析。从 NCBI 数据库下载 QHQC2 近缘噬菌体的衣壳蛋白和末端大亚基序列,使用 MEGA X 构建系统发育树,模型使用 ClustaW 选项和邻接法,并重复 1 000 次。

结 果

1 噬菌体的分离纯化

QH2 经过纯化培养后利用双层平板测定滴度,结果如图 1。在双层板上可见空的噬菌斑,噬斑周围会出现晕环,中心呈现透亮,表明 QH2 属于裂解性较强的噬菌体,周围的晕环提示 QH2 可能具备产生解聚酶的能力。

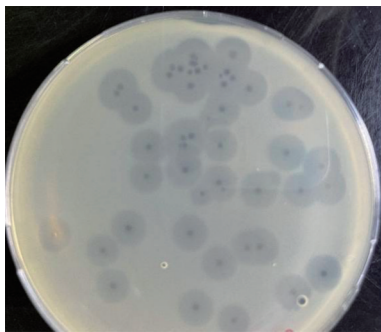


图 1 噬菌体 vB_KpnP_QH2 在含有宿主菌 QHQC 培养基(0.7%琼脂)上形成的噬菌斑

Fig. 1 The plaque of bacteriophages vB_KpnP_QH2. Plaque morphology of phage vB_KpnP_QH2 on a bacterial lawn of *K. pneumoniae* QHQC in nutrient broth with 0.7% agar

2 噬菌体裂解谱

取 8 株 KP 进行双层板试验,结果如表 1。QH2 对其中 3 株具有裂解能力。

表 1 QH2 裂解谱

菌株编号 No.	裂解性 Lytic ability
A5570(耐药)	+
A4813(耐药)	+
A3877(耐药)	-
A4465(耐药)	-
A5379(敏感)	-
A4652(敏感)	-
A4645(敏感)	-
A2951(敏感)	+

注:“+”为裂解;“-”为不裂解。

Notes:“+” Indicates cleavage;“-” Indicates no cleavage.

3 噬菌体的形态特征

透射电子显微镜观察 QH2 属于有尾噬菌体目长尾科噬菌体,由一个头部约为 70 nm 的正二十面体和尾部约为 120 nm 的一个不可收缩尾巴所组成(图 2)。

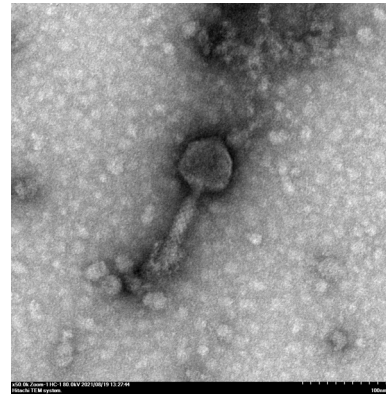


图 2 噬菌体 QH2 电镜图(比例尺 100nm)

Fig. 2 TEM observation of bacteriophage QH2 (scale 100nm)

4 噬菌体 MOI 测定

将宿主菌 QHQC 和 QH2 按照一定比例混合,测定噬菌体的 MOI,结果如图 3。当 MOI=0.00001 时, QH2 侵染宿主能够释放数量最多的子代噬菌体, QH2 能够产生最大滴度,即 0.00001 是 QH2 的最佳 MOI。

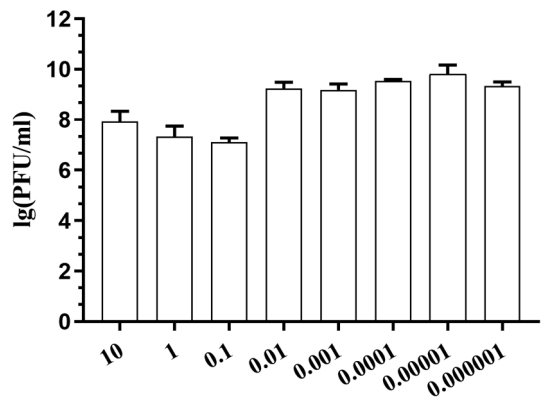
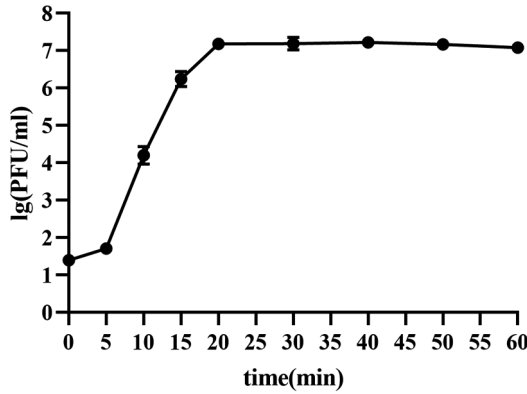


图 3 噬菌体 QH2 最佳感染复数

Fig. 3 Multiplicity of infection of bacteriophage QH2

5 噬菌体一步生长曲线

如图4所示,当MOI为0.00001时,QH2潜伏期为5 min,爆发期为15 min;20 min之后进入平台期,裂解量为 2.8×10^9 pfu/cell。



注:每个感染细胞的PFU对应不同时间点,每个黑色圆点代表3次独立试验的平均值,误差线为标准差。

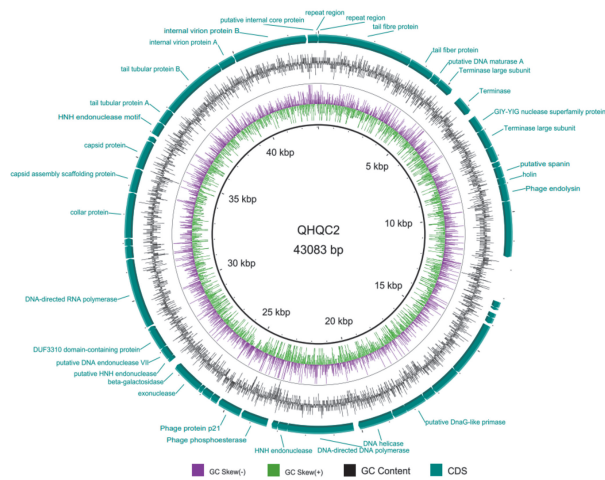
图4 噬菌体一步生长曲线

Notes: The PFU of each infected cell is shown at different time points. Each black point represents the mean of three independent experiments, and the error bar represents the standard deviation.

Fig. 4 One-step growth curve of bacteriophage of QH2

6 基因序列分析

QH2基因组全长43083bp,为双链DNA,GC含量53.88%,基因组首尾末端包含一个127bp的重复序列。使用TMHMM和tRNA Scan-SE数据库分析噬菌体序列,未找到tRNA结构和跨膜蛋白。VFDB和ResFinder分析显示QH2不携带已知的毒力因子和耐药基因。使用RAST进行注释并使用NCBI蛋白数据库验证,共预测到52个开放阅读框(ORFs),占全基因组的93.02%,且所有ORF均在一个方向上转录(图5)。



注:中间黑色圆圈表示GC内容;紫色圆圈表示GC偏斜。

图5 噬菌体QH2全基因组图谱

Notes: The black circle in the middle represents the GC content; the violet circle represents GC skew.

Fig. 5 The genetic and physical organization of QH2 genome

开放阅读框(ORFs)分析如表2,有19个为假设蛋白,33个CDS编码具有结构、DNA包装、裂解、代谢、DNA复制和转录等功能的蛋白质,表明该噬菌体功能较完整。

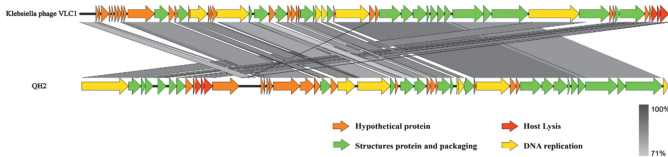
表2 QH2基因组ORF分析
Table 2 The ORF analysis of QH2 genome

开放阅读框 ORFs	开始 Start	结束 Stop	链 Strand	功能 Function
ORF1	1	127	+	repeat region
ORF2	3	3443	+	peptidoglycan lytic exotransglycosylase
ORF3	3445	4368	+	Phage non-contractile tail fiber protein Gp17
ORF4	4380	4682	+	Phage terminase small subunit Gp18, DNA packaging
ORF5	4682	5254	+	Phage terminase large subunit Gp19, DNA packaging
ORF6	5598	6212	+	Phage terminase large subunit Gp19, DNA packaging
ORF7	6423	6974	+	GIY-YIG nuclease superfamily protein
ORF8	6975	7637	+	Phage terminase large subunit Gp19, DNA packaging
ORF11	8382	8786	+	putative spanin
ORF12	8779	9030	+	Phage holin
ORF13	9014	9622	+	Phage endolysin
ORF22	17523	18314	+	Phage primase/helicase protein Gp4A
ORF24	18813	20093	+	Phage DNA helicase
ORF25	20276	22687	+	Phage DNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.7)
ORF26	22671	23033	+	Phage HNH homing endonuclease (ACLAME 27)
ORF28	23414	24394	+	Phage phosphoesterase
ORF29	24446	25306	+	Phage proteinp21
ORF33	26169	27137	+	Phage exonuclease (EC 3.1.11.3)
ORF34	27094	27297	+	beta-galactosidase
ORF35	27546	27695	+	putative HNH endonuclease
ORF36	27677	28099	+	putative DNA endonuclease VII
ORF37	28096	28845	+	DUF3310 domain-containing protein
ORF39	28987	31455	+	Phage DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6)
ORF42	32189	33784	+	Phage collar, head-to-tail connector protein Gp8
ORF43	33799	34641	+	Phage capsid assembly scaffolding protein p31
ORF44	34668	35687	+	Phage major capsid protein Gp10A
ORF46	35969	36442	+	Phage protein Gp2.8/Gp7.7 contains HNH endonuclease motif
ORF47	36454	36990	+	Phage non-contractile tail tubular protein Gp11
ORF48	37000	39360	+	Phage non-contractile tail tubular protein Gp12
ORF49	39362	39949	+	Phage internal virion protein A
ORF50	39966	42650	+	Phage internal virion protein B
ORF51	42701	43081	+	peptidoglycan lytic exotransglycosylase
ORF52	42957	43083	+	repeat region

将QH2的全基因组序列上传至NCBI-BlastN网站进行比对分析(表3),QH2与Klebsiella phage VLC1序列同源性最高(相似性为92.46%,覆盖率为78%)。将同源性最高的噬菌体VLC1与QH2进行比对,主要差异在假设蛋白区域(图6)。在整个进化过程中,噬菌体主要衣壳蛋白(MCP)和末端大亚基(TerL)相对较保守^[16],所以依据MCP和TerL构建系统发育树;选取10株与QH2亲缘较近的噬菌体,并加入其他宿主菌的噬菌体作为外群,使用MEGA X构建系统发育树,结果如图7。QH2与已发现的KP噬菌体有密切的进化关系。

表3 QH2与同源噬菌体基因组比较分析
Table 3 Whole genome-based databank homologies of phage QH2 according to NCBI

菌株 Strains	覆盖度(%) Coverage(%)	一致性(%) Identity(%)	登录号 Accession Number
<i>Klebsiella</i> phage VLCl	78	92.46	MN794000.1
<i>Klebsiella</i> phage VLCPiA1m	79	91.94	ON602727.1
<i>Klebsiella</i> phage VLCPiA1l	81	90.69	ON602740.1
<i>Klebsiella</i> phage VLCPiA1d	77	89.74	ON602762.1
<i>Bacteriophage</i> sp. isolate 1078_68233	79	88.38	OP073663.1



注:橙色代表假释蛋白;红色代表宿主裂解相关蛋白;绿色代表结构组成蛋白;黄色代表DNA复制相关蛋白。且颜色越深,相似度越高。

图6 QH2与VLCl相似性分析

Notes: Different colors represent genes with different protein: orange for hypothetical protein, red for host lysis, green for structures protein and packing, yellow for DNA replication protein. The darker the color, the higher similarity.

Fig. 6 Similarity analysis between QH2 and VLCl

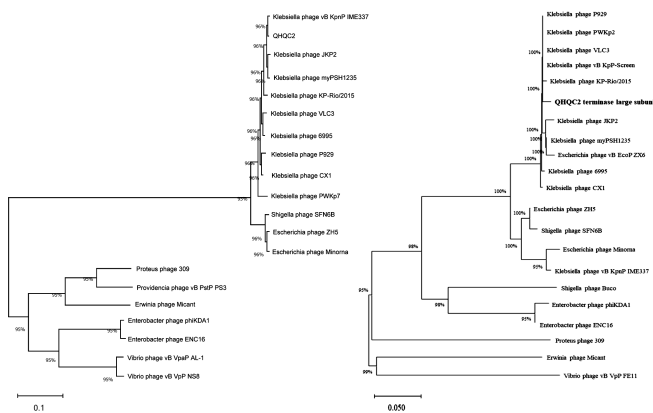


图7 依据QH2主要衣壳蛋白(MCP)和末端大亚基(TerL)构建进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree constructed from major capsid proteins and terminase large subunit sequences of phage QH2

讨论

抗生素从被发现以来一直作为有效手段用于治疗细菌感染,但随着抗生素不规范使用甚至滥用,导致“超级细菌”的出现,使得噬菌体治疗再次受到广泛关注。目前已有许多噬菌体治疗成功案例的报道,例如使用噬菌体鸡尾酒疗法治疗KP引起的胃肠道、尿路感染;噬菌体静脉注射治疗因人工关节置换手术而发生的细菌感染^[17-19]。经过噬菌体治疗后大部分病人细菌感染症状得到显著改善,且无不良反应,可见用噬菌体及其编码产物治疗耐药细菌感染安全、有效^[20]。

本研究对从医院污水中分离的QH2进行纯化,在双层平板上呈现带有晕环的中间透亮的较大噬菌

斑,属于裂解噬菌体,与P24噬菌体相似^[21]。电镜观察正QH2由一个二十面体和一个不可收缩尾巴组成。噬菌体的尾部可以使细菌胞外多糖裂解,使噬菌斑周围产生大小不均的半透明区域^[22],它的存在表明噬菌体具有解聚酶活性,而解聚酶是治疗抗生素耐药性细菌感染的潜在位点^[23]。

噬菌体的最佳MOI值是不同的,最佳MOI值越小,需要裂解相同数量细菌的噬菌体就越少。QH2的MOI为0.00001,查阅文献除vB_KpnP_ZK2的MOI(0.00000001)小于QH2外,其他如VB_kpnM_17-11、vB_KpnP_IME337 MOI(0.001)均大于QH2,表明QH2具有高效裂解能力^[24-26]。当QH2 MOI为0.00001时,单位噬菌体产生最多的后代并具有最高的增殖效率。在噬菌体的工业化制备过程中,为了获得较高的滴度,经常根据最佳的MOI培养噬菌体,从而降低生产成本,提高利润。一步生长曲线显示QH2具有较强的裂解能力,潜伏期为5 min,爆发期为15 min,与VB_kpnM-vAC66的潜伏期、爆发期基本相同^[27]。噬菌体孵育期较短,可在单位时间内增加噬菌体的数量。选择8株代表性KP作为宿主菌进行裂解,有3株裂解,包括2个耐药株(属于耐碳青霉烯类),1个药物敏感株。从裂解范围看QH2裂解谱较窄,而宿主范围差异异常与噬菌体尾部结构负责识别和吸附的蛋白有关^[26]。因此可通过对尾部蛋白作进一步研究,以期拓展QH2的宿主谱。

基因组信息分析显示,QH2噬菌体具有穿孔素(Holin)和裂解酶(Endolysin)的基因,以此来裂解细菌,符合dsDNA噬菌体的特征,它们大多具有Holin-Endolysin系统^[28]。QH2在双层平板培养后出现晕环,由噬菌体的内容素所致。内容素(phage endolysin)是目前研究最多的一种噬菌体解聚酶,依据基因组分析ORF13是噬菌体内内容素,可进入细菌内部而不被细胞膜所约束,直接达到消灭细菌的目的^[29],具备杀菌快速、细菌抗性低、杀菌活性广泛等特点,被优先用于治疗多重耐药细菌感染。

依据基因组分析,ORF26(Phage HNH homing endonuclease)为归巢核酸内切酶,通过在DNA序列上确定的位置引入双链断裂(double-strand breaks, DSBs)来启动迁移性位点上特异性内切核酸酶,触发调动内切核酸酶编码区的修复和重组途径^[30]。QH2属于Slopekvirinae亚科,Drulivirus属,unclassified Drulivirus种,基本特征与肌病毒科噬菌体相似,都属于dsDNA噬菌体,编码相同功能的基因排列成簇^[31]。QH2的编码基因紧密排列,而基因组越小,复制成本越低。依据主要衣壳蛋白(MCP)和末端大亚基(TerL)分别对QH2构建进化树,该噬菌体与*Kleb-*

siella phage vB_kpnP IME337 在结构组成上具有相同的保守结构。TerL 进化显示, QH2 与 *Klebsiella* phage VLC3 具有近亲缘关系。

综上, 从医院污水中分离筛选的 QH2 能特异裂解多重耐药肺炎克雷伯菌, 且其生物学特性稳定、安全, 可为多重耐药肺炎克雷伯菌感染的治疗提供参考。

【参考文献】

- [1] Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS, et al. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection [J]. Front Microbiol, 2021, 12:750662.
- [2] Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(9):785-796.
- [3] 张颖, 李轶, 郭思. 高毒力肺炎克雷伯菌分子致病机制研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(9):1298-1301.
- [4] Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! an update from the infectious diseases society of America [J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(1):1-12.
- [5] Tacconelli E. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development. (World Health Organization, 2017)
- [6] Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2):e00066-00018.
- [7] Balco V M, Moreli F C, Silva E C, et al. Isolation and molecular characterization of a novel lytic bacteriophage that inactivates MDR *Klebsiella pneumoniae* strains [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(7):1421.
- [8] Fang Q, Feng Y, McNally A, et al. Characterization of phage resistance and phages capable of intestinal decolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice [J]. Commun Biol, 2022, 5(1):1-14.
- [9] Wu LT, Chang SY, Yen MR, et al. Characterization of extended-host-range pseudo-T-even bacteriophage Kpp95 isolated on *Klebsiella pneumoniae* [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(8):2532-2540.
- [10] Hung CH, Kuo CF, Wang CH, et al. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(4):1358-1365.
- [11] Kesik-Szeloch A, Drulis-Kawa Z, Weber-Dąbrowska B, et al. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Virol, 2013, 10(1-12).
- [12] Forde A, Hill C. Phages of life—the path to pharma [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(3):412-418.
- [13] Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy [J]. Bacteriophage, 2011, 1(2):111-114.
- [14] Bao J, Wu N, Zeng Y, et al. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1):771-774.
- [15] Li Y, Wang M, Liu Q, et al. Complete genomic sequence of bacteriophage H188: A novel vibrio kanaloe phage isolated from yellow sea [J]. Curr Microbiol, 2016, 72(5):628-633.
- [16] Bai Q, Zhang W, Yang Y, et al. Characterization and genome sequencing of a novel bacteriophage infecting *Streptococcus agalactiae* with high similarity to a phage from *Streptococcus pyogenes* [J]. Arch Virol, 2013, 158(8):1733-1741.
- [17] Cano EJ, Caflisch KM, Bollyky PL, et al. Phage therapy for limb-threatening prosthetic knee *Klebsiella pneumoniae* infection: case report and in vitro characterization of anti-biofilm activity [J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(1):e144-e151.
- [18] Corbellino M, Kieffer N, Kutateladze M, et al. Eradication of a multidrug-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom made, lytic bacteriophage preparation [J]. Clin Infect Dis, 2020, 70(9):1998-2001.
- [19] Uyttendaele S, Chen B, Onsea J, et al. Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: A systematic review [J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(8):e208-e220.
- [20] Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, et al. Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms [J]. Front Microbiol, 2018, 9:2517.
- [21] Fang Q, Feng Y, McNally A, et al. Characterization of phage resistance and phages capable of intestinal decolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice [J]. Commun Biol, 2022, 5(1):48.
- [22] Cornelissen A, Ceysens PJ, T'syen J, et al. The T7-related *Pseudomonas putida* phage ϕ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties [J]. PLoS One, 2011, 6(4):e18597.
- [23] Dunstan RA, Bamert RS, Belousoff MJ, et al. Mechanistic insights into the capsule-targeting depolymerase from a *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage [J]. Microbiol Spectr, 2021, 9(1):e01023-01021.
- [24] Gao M, Wang C, Qiang X, et al. Isolation and characterization of a novel bacteriophage infecting carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Curr Microbiol, 2020, 77:722-729.
- [25] 赵日虹, 贺蔚纬, 姜秋杰, 等. K47 型肺炎克雷伯菌噬菌体 vB_KpnP_ZK2 的生物学特性及基因组分析 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(05):906-912.
- [26] Bai J, Zhang F, Liang S, et al. Isolation and characterization of vB_kpnM_17-11, a novel phage efficient against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:897531.
- [27] Pacios O, Fernandez-Garcia L, Bleriot I, et al. Phenotypic and genomic comparison of *Klebsiella pneumoniae* lytic phages: vB_KpnM-VAC66 and vB_KpnM-VAC13 [J]. Viruses, 2022, 14(1):6.
- [28] Young R, Wang N, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis [J]. Trends Microbiol, 2000, 8(3):120-128.
- [29] Yuan Y, Li X, Wang L, et al. The endolysin of the *Acinetobacter baumannii* phage vB_AbaP_D2 shows broad antibacterial activity [J]. Microb Biotechnol, 2021, 14(2):403-418.
- [30] Edgell DR, Gibb EA, Belfort M. Mobile DNA elements in T4 and related phages [J]. J Virol, 2010, 7(1):1-15.
- [31] Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(3):125-138.